

氏名	なかむらよしお 中村嘉夫
学位(専攻分野)	博士(医学)
学位記番号	医博第2236号
学位授与の日付	平成12年3月23日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	医学研究科内科系専攻
学位論文題目	Characterization of Prop-1 Gene Expression in Normal Pituitary and Pituitary Adenomas in Humans. (ヒト正常下垂体及び下垂体腫瘍における Prop-1 遺伝子の発現の特徴)

論文調査委員 (主査) 教授 中畑龍俊 教授 伊藤嘉明 教授 中尾一和

論文内容の要旨

Prophet of Pit-1 (Prop-1) は1996年、小人症モデル動物の1つである Ames マウスの責任遺伝子としてクローニングされた paired-like ホメオドメイン転写因子である。Prop-1 は Pit-1 遺伝子のエンハンサーとして働き、その遺伝子発現を調節していると考えられており、その遺伝子変異がヒトにおいても家族性複合性下垂体ホルモン欠損症の原因となることも明らかになってきた。本研究では、ヒトにおける Prop-1 の機能を明らかにするため、まずヒト Prop-1 cDNA をクローニングし、その転写活性化能と正常下垂体での発現を検討した。次に Prop-1 と下垂体腺腫発生の関係を明らかにするために、各種下垂体腺腫における Prop-1 遺伝子の発現と、その遺伝子変異について検討した。

1. ヒト Prop-1 cDNA のクローニングと、その転写活性化能と正常下垂体での発現の検討

マウス Prop-1 のアミノ酸配列を基に設計した degenerate primer を用いて、ヒト下垂体 cDNA を鋳型として degenerate PCR を行い、ヒト Prop-1 と考えられるクローンを単離し、その塩基配列を決定した。この配列を基に RACE 法を用いて全 cDNA 配列を決定した。ヒト Prop-1 は 226 個のアミノ酸から成り、その N 端、ホメオドメイン、C 端はマウス Prop-1 とそれぞれ 48.5%, 93.3%, 77.6% の相同性を示し、既報の配列とは 142 番目のアミノ酸がアラニンがスレオニンである点以外は同一のものであった。このアミノ酸変異は種々の検討により多型性と考えられた。レポーター遺伝子を用いた転写活性部位の検討では、C 端にのみ転写活性化能が認められ、マウスと同様の結果を示した。ノーザンブロット法では、成人組織では下垂体においてのみ Prop-1 遺伝子の発現が認められ、他の組織では認められなかった。これは、マウスにおいては Prop-1 は胎生期のみにその発現が下垂体に認められ、出生後はほとんど認められないという報告とは異なるものであり、Prop-1 の発現パターンに種差のある可能性が示唆された。

2. 下垂体腫瘍におけるヒト Prop-1 遺伝子の発現とその変異の検討

RT-PCR 法を用いた検討では、Pit-1 遺伝子の発現が GH, PRL, TSH 産生腺腫のみに認められたのに対して、Prop-1 遺伝子の発現は ACTH 産生腺腫や、その多くがゴナドトロピンを分泌していると考えられている非機能性腺腫においても認められた。また *in situ* ハイブリダイゼーションにて、GH 産生腺腫細胞において Prop-1 mRNA と GH mRNA の共存が認められ、下垂体腺腫細胞における Prop-1 遺伝子の発現を確認した。ACTH 産生腺腫や非機能性腺腫における Prop-1 の生理的意義に関しては不明であるが、Prop-1 遺伝子変異をもつ複合性下垂体ホルモン欠損患者の中には GH, PRL, TSH を欠損しているだけでなくゴナドトロピン系の障害および時として ACTH 系にも障害を合併することより、Prop-1 は Pit-1 遺伝子のエンハンサーとしての機能以外にも直接、または他の転写因子を介して ACTH, LH, FSH 遺伝子の発現調節にも関与している可能性が考えられた。次に各種下垂体腫瘍から得られた Prop-1 cDNA の核酸配列を直接シーケンス法にて検討すると、14 例中 7 例においてのべ 10 カ所の mutation を認めたが、いずれも silent mutation であった。よって、ヒト Prop-1 遺伝子の変異が下垂体腫瘍発生に関わっている可能性は低いと考えられた。

論文審査の結果の要旨

Prophet of Pit-1 (Prop-1) は小人症モデルマウスの責任遺伝子としてクローニングされた paired-like ホメオドメイン転写因子であり、その蛋白は既知の下垂体特異的転写因子 Pit-1 のエンハンサーとして働き、その遺伝子変異がヒトにおいても家族性複合性下垂体ホルモン欠損症の原因となることが明らかになってきた。本研究では、ヒトにおける Prop-1 の機能を明らかにするため以下の検討を行った。まずヒト Prop-1 cDNA をクローニングし、1 アミノ酸置換を伴う遺伝子多型を見出した。レポーター遺伝子を用いた転写活性化部位の検討では、マウスと同じく C 端のみに転写活性化能が見られた。ノーザンブロット法で、Prop-1 の発現は胎児期のみ認められるマウスと異なり、ヒトでは成人下垂体でも認められた。次に RT-PCR 法を用いた検討では、ヒト Rprop-1 の発現は、*Pit1* が発現していない ACTH 産生腫瘍や非機能性腺腫を含めた全ての下垂体腫瘍に認められ、Prop-1 の ACTH, LH, FSH 遺伝子発現への関与が示唆された。また各種下垂体腫瘍から得られた Prop-1 cDNA の核酸配列を検討したが、アミノ酸置換を伴う変異を認めず、Prop-1 の下垂体腫瘍発生への関与は少ないと考えられた。

以上の研究はヒトにおける Prop-1 の病態生理的意義の解明に貢献し、下垂体機能異常症の分子医学的解明に寄与するところが多い。

したがって、本論文は博士（医学）の学位論文として価値あるものと認める。

なお、本学位授与申請者は、平成 12 年 2 月 28 日実施の論文内容とそれに関連した試問を受け、合格と認められたものである。